

DIAZOTROFOS EN VAINAS DE HOJAS DE CAÑA DE AZÚCAR APORTAN NITRÓGENO AL CULTIVO CON LAS PRECIPITACIONES PLUVIALES

Nitrogen Contribution of Diazotrophic Bacteria from Sugarcane Leaves to Crop Yield During
Rainfall

S. Carrizo-de Bellone^{1†} y C. H. Bellone¹

RESUMEN

En Tucumán, Argentina, las vainas de hojas de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) de las variedades Tuc 77-42 y CP 65-350, son colonizadas por microorganismos fijadores de nitrógeno como *Beijerinckia* sp. y *Herbaspirillum* sp. Las vainas de las hojas +2 a +10 demostraron ser capaces de retener una importante cantidad de agua de las precipitaciones pluviales (3 a 5 mL), conteniendo nutrimentos que permiten el desarrollo y la actividad de dichos microorganismos. Los líquidos retenidos en las vainas de las hojas se colectaron asepticamente y se inocularon en medios de cultivos semisólidos, libres de nitrógeno, a fin de aislar y caracterizar los diazotrofos. El contenido de nitrógeno en las muestras líquidas se determinó con el método de Kjeldahl. Se observó que los mismos aportan al cultivo de 3.0 a 3.17 kg ha⁻¹ y por precipitación, resultando relevante debido a la elevada demanda de nitrógeno por parte del cultivo de caña de azúcar.

Palabras clave: *Saccharum* sp., fijadores de nitrógeno, precipitaciones pluviales, vainas de caña de azúcar.

SUMMARY

In Tucuman, Argentina, the leaf sheaths of sugarcane (*Saccharum* sp.) varieties Tuc 77-42 and CP 65-350 are colonized by nitrogen fixing microorganisms like *Beijerinckia* sp. and *Herbaspirillum* sp. The leaf sheaths +2 to +10 were able to retain the rainfall water in significant quantities (3-5 mL), containing nutrients that allow the development

and the activity of these microorganisms. The liquids retained in the leaf sheaths were collected aseptically and inoculated in nitrogen free semisolid mediums, in order to isolate and to characterize the diazotrophs. The nitrogen content in the liquid samples was determined with the Kjeldahl method. It was observed that they contribute to the culture from 3.0 to 3.17 kg ha⁻¹ and by precipitation, being relevant due to the elevated nitrogen demand by sugar cane.

Index words: *Saccharum* sp., nitrogen fixers, rainfall, sugar cane sheaths.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la caña de azúcar en la provincia de Tucumán, Argentina, es principalmente de secano y se realiza entre zonas semiáridas del parque Chaqueño, al este, y tropicales húmedas, como la selva tucumano-oranense, al oeste del área cañera. Las lluvias son del tipo monzónico, existiendo una disminución de oeste a este de 1500 a 700 mm año⁻¹ (Torres-Bruchmann, 1979). Las fluctuaciones de temperatura y humedad que soportan las hojas son un mecanismo natural de selección de las poblaciones microbianas presentes en ellas, que incluye bacterias diazotróficas, como *Beijerinckia* (Ruinen, 1961, 1965). Las raíces de caña de azúcar son colonizadas endofíticamente por microorganismos fijadores de nitrógeno, como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* y *Azospirillum brasilense* (Reis *et al.*, 1990; Döbereiner *et al.*, 1993; Bellone, 1996; Bellone y Carrizo-de Bellone, 1993; Pedraza y Díaz Ricci, 2003). Los diazotrofos que logran colonizar el interior de las raíces tienen una menor competencia por los sustratos disponibles, hecho muy importante por la gran demanda de energía que requiere el proceso de fijación (Falk *et al.*, 1985).

Estudios realizados en la parte aérea de la caña de azúcar revelan que también están colonizados

¹ Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Av. Roca 1900, 4000 Tucumán, Argentina.

[†] Autor responsable (sicabel@manant.unt.edu.ar)

endofíticamente por microorganismos de los géneros *Beijerinckia*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* y *Azospirillum* (Döbereiner *et al.*, 1993; Carrizo-de Bellone, 2000). La naturaleza endofítica de estos diazotrofos permite encontrarlos dentro de las hojas, donde el contenido de amonio es alto y sólo inhibe, en forma parcial, a la enzima nitrogenasa (Fu y Burris, 1989; Reis *et al.*, 1990).

En el año 2000, Carrizo-de Bellone analizó las células meristemáticas de las hojas embrionarias de caña y encontró que estaban colonizadas por fijadores de nitrógeno. La presencia de diazotrofos, tanto en hojas meristemáticas, como en hojas verdaderas, permite plantear si estos microorganismos aportaban nitrógeno al cultivo por el agua de las lluvias en el mayor período de crecimiento de la caña de azúcar, época en que las vainas de cada planta tienen capacidad de retener agua de las precipitaciones.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue valorar aportes de nitrógeno al cultivo de caña de azúcar por medio de los diazotrofos que se encuentran colonizando sus vainas, después de las precipitaciones pluviales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los muestreos se realizaron desde octubre a febrero de los años 1999-2000, durante el desarrollo del cultivo de la caña de azúcar (entre 80 y 180 días). Se seleccionaron localidades cultivadas del pedemonte tucumano con alta frecuencia (1500 mm) de precipitación como Fronterita, Manantial y San Pablo. En las localidades seleccionadas se realizaron registros de las precipitaciones máximas con intervalos de recurrencia, precipitaciones diarias y las sumas totales mensuales de cada año (Gumbel, 1954). Para el monitoreo se utilizaron dos variedades: Tuc 77-42 y CP 65-350, tomando al azar 100 plantas de caña por cada localidad y variedad.

Los líquidos retenidos en las vainas de las hojas +2 hasta +10 (Clements, 1980) de 50 plantas seleccionadas en cada localidad, se recolectaron con

jeringas estériles, inmediatamente después de cada precipitación y 72 h después, de las otras 50 cañas seleccionadas (estos intervalos se determinaron por ensayos preliminares que dieron, a las 72 h, un número de microorganismos fijadores de N_2 (10^1 - 10^3) que permitía cumplir con el objetivo planteado). Los líquidos obtenidos de las 2700 vainas se colocaron (por separado) en frascos estériles y se mantuvieron a 4 °C, hasta su procesamiento (dentro de las 24 h). Se realizaron mediciones volumétricas de las muestras y luego se separaron en alícuotas. Con una de ellas se realizaron cultivos en medios para fijadores de nitrógeno: NFB (*Azospirillum*), JNFb (*Herbaspirillum*), LGI-P (*Gluconacetobacter*), de acuerdo con Döbereiner *et al.* (1995a) y para *Beijerinckia* con Girard y Rougieux (1964). Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 72 h. Los microorganismos aislados se purificaron, se caracterizaron bioquímicamente y se cuantificaron, de acuerdo con Cavalcante y Döbereiner (1988) y Döbereiner *et al.* (1995a). A los microorganismos aislados, se les determinó su capacidad diazotrófica mediante RA (reducción de acetileno) por cromatografía en fase gaseosa, de acuerdo con Boddey (1987). En la alícuota restante, se determinó el contenido de nitrógeno total por Kjeldahl. Para el análisis estadístico se utilizó la Prueba t ($P = 0.001$) para comparar medias calculadas con varianzas desiguales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los microorganismos aislados en las muestras de líquidos pluviales retenidos en vainas de caña de azúcar se identificaron, de acuerdo con Döbereiner *et al.* (1995a), como *Beijerinckia* sp. y *Herbaspirillum* sp.

Se conoce que las bacterias fijadoras de nitrógeno que se encuentran colonizando las partes internas del tallo oxidan hidratos de carbono como fuente energética para su multiplicación (James, 2000; James *et al.*, 2001), lo que explica el aumento de microorganismos, fijadores de nitrógeno encontrados en los cultivos de los líquidos

Cuadro I. Intervalo del número de microorganismos por mililitro de líquidos retenidos en las vainas de caña de azúcar de las variedades Tuc 77-42 y CP 65-350 en muestras obtenidas 1 h después de la precipitación en tres localidades del pedemonte tucumano.

Variedad	San Pablo		Manantial		Fronterita	
	B sp. [†]	H sp. [‡]	B sp.	H sp.	B sp.	H sp.
Tuc 77-42	20.5 ± 1.4	2.2 ± 0.5	42.5 ± 8.4	1.2 ± 0.7	5.3 ± 1.1	1.1 ± 0.3
CP 65-350	19.4 ± 0.9	2.1 ± 0.7	12.2 ± 5.1	2.3 ± 1.0	8.1 ± 1.4	3.1 ± 1.0

[†] B sp.: *Beijerinckia* sp. [‡] H sp.: *Herbaspirillum* sp.

Cuadro 2. intervalo del número de microorganismos por mililitro de líquidos retenidos en las vainas de caña de azúcar de las variedades Tuc 77-42 y CP 65-350 en muestras obtenidas 72 h después de una precipitación, en tres localidades del pedememonte tucumano.

Variedad	San Pablo		Manantial		Fronterita	
	B sp. [†]	H sp. [‡]	B sp.	H sp.	B sp.	H sp.
Tuc 77-42	2900 ± 70.2*	80.4 ± 8.4*	4000.0 ± 52.1*	100.3 ± 9.2*	320 ± 11.1*	196.3 ± 20.7*
CP 65-350	200 ± 31.3*	50.6 ± 7.0*	1000.6 ± 92.3*	50.5 ± 7.7*	650 ± 14.2*	98.4 ± 12.3*

* Valores significativos con respecto a los obtenidos a 1 h de precipitación, t (P = 0.001).

[†]B sp. = *Beijerinckia* sp. [‡]H sp. = *Herbaspirillum* sp.

obtenidos de las vainas a las 72 h con respecto a las muestras analizadas inmediatamente después de las precipitaciones (Cuadros 1 y 2).

Los resultados de RA de los fijadores de nitrógeno aislados de las vainas se observan en el Cuadro 3. Estos fueron relevantes y similares a los encontrados por otros autores, como Boddey (1987) y Bellone (1996), lo que demuestra una actividad importante de la enzima nitrogenasa.

Las lluvias estivales en los años 1999-2000 coincidieron con el gran crecimiento de la caña de azúcar (período cuando se incrementan la altura y el diámetro del tallo) y se dio un intervalo de 6 a 19 días mensuales con un total de 140 a 150 días de precipitación anual, respectivamente. El total de lluvia fue de 7 a 434 mm con 1287 mm anuales (Medina, 1999). En esta etapa, las vainas con capacidad para retener agua fueron entre 8 y 10 por planta, reteniendo cada una entre 4 y 6 mL de agua en la hora posterior a cada precipitación. La cantidad de lluvia retenida fue menor en las vainas +2 a +6, con valores de 1.98 a 2.06 mL para la variedad Tuc 77-42 y de 2.09 a 2.19 mL en la variedad CP 65-350, con respecto a los volúmenes retenidos en las vainas +7 a +10 que fueron de 3.16 a 3.30 mL y de 3.08 a 3.20 mL para las mismas variedades. El promedio obtenido por planta (nueve vainas) para las dos variedades fue de 50 mL de agua por precipitación.

La caña de azúcar, analizada en las diferentes regiones, fue principalmente caña soca con un promedio de 100 000 plantas ha⁻¹, resultando una retención por precipitación de 5000 L ha⁻¹.

Cuadro 3. Reducción de acetileno (RA) en bacterias aisladas en líquidos retenidos en las vainas.

Bacterias fijadoras	RA
<i>Beijerinckia</i> sp.	77.16 ± 7.25
<i>Herbaspirillum</i> sp.	108.73 ± 12.40

Ref.: valores expresados en nMoles de etileno producido por hora a 30 °C y en 10 mL concentración bacteriana 1 x 10⁷.

El contenido de nitrógeno total determinado a 80 de las muestras obtenidas 72 h después de una precipitación pluvial en cada localidad (número estimado por estudios previos que permitieron estimar una varianza baja, dada la uniformidad de la población muestreada entre la que cuentan manejo, condiciones de suelo y edad de la planta), dio entre 0.048 y 0.060% de nitrógeno, para la variedad Tuc 77-42, y entre 0.050 y 0.063%, para la variedad CP 65-350 (Cuadro 4), a diferencia de las muestras recogidas 1 h después de una precipitación pluvial y de un blanco de reactivos analizado simultáneamente que no presentaban valores medibles, debido al bajo número de microorganismos fijadores de nitrógeno. El incremento en el número de microorganismos se dio posiblemente por las condiciones nutritivas adecuadas que presentan los líquidos retenidos en las vainas. Por otro lado, la temperatura ambiental (20 a 28 °C) en los períodos de muestreo favoreció este incremento bacteriano. La población de *Beijerinckia* sp. fue mayor que la de *Herbaspirillum* sp., cuya mayor RA (Cuadro 3) compensó, en cierta medida, la diferencia numérica.

Teniendo en cuenta el total de líquido retenido en una hectárea, el aporte al cultivo sería de 3 kg de nitrógeno por hectárea y por precipitación. Este aporte de nitrógeno dependería de la frecuencia y de los intervalos de recurrencia de las lluvias. Aunque las precipitaciones varían de año en año en el área cañera, se pueden inferir importantes contribuciones de nitrógeno por esta vía (Cuadro 4). Los valores obtenidos con altamente significativos para la prueba t (P = 0.001).

Si se considera el valor mínimo de seis días de precipitación por mes, el aporte de nitrógeno al cultivo sería de 18 kg ha⁻¹ mes⁻¹. En el caso de mayor frecuencia mensual, con 19 días de precipitación, llegaría a 57 kg ha⁻¹ mes⁻¹. Este aporte de nitrógeno es importante para el cultivo, debido al alto poder extractivo de la caña de azúcar con respecto al nitrógeno y explicaría, en parte, cómo suelos cultivados con caña de

Cuadro 4. Cantidad de líquidos (en mL) retenida en nueve vainas en las tres localidades muestreadas, aporte de nitrógeno por ha y por precipitación y porcentaje de nitrógeno (N%).

Variedad	Vainas (9)		Agua retenida ha-1		N ha ⁻¹ / precipitación		N %
	+2 +6	+7 +10	+2 +6	+7 +10	+2 +6	+7 +10	
Tuc 77-42	20.2 ± 0.4	32.2 ± 0.7*	2000 ± 44	3230 ± 70*	1.28 ± 0.2	1.96 ± 0.2*	0.048-0.060
CP 65-350	21.4 ± 0.5	31.4 ± 0.6*	2140 ± 50	3140 ± 60*	1.09 ± 0.3	2.04 ± 0.4*	0.050-0.063

* Valores significativos para t (P = 0.001).

azúcar mantenían su fertilidad por varios años y con buenos rendimientos sin la aplicación de fertilizantes, a lo que se sumaría la capacidad de fijación que tienen los endófitos en toda la parte aérea de la caña de azúcar (Olivares et al., 1996; Carrizo-de Bellone, 2000).

CONCLUSIONES

Las vainas de diferentes variedades de caña de azúcar cultivadas en el pedemonte de la provincia de Tucumán, Argentina, se encuentran colonizadas por microorganismos fijadores de nitrógeno de los géneros *Beijerinckia* y *Herbaspirillum* que aportan desde 18 a 57 kg ha⁻¹ mes⁻¹ de nitrógeno al cultivo con el agua de lluvia retenida en sus vainas.

LITERATURA CITADA

- Bellone, C. H. 1996. Micorrización y fijación de nitrógeno en el área cañera de la Provincia de Tucumán. Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán, Argentina.
- Bellone, C. H. y S. Carrizo-de Bellone. 1993. Nitrogenase, cellulase and pectinase activity in sugar cane roots inoculated together with v.a. mycorrhiza and nitrogen-fixing bacteria. pp. 69-75. In: N. Hegazy, M. Fayed y M. Monib (eds.). Nitrogen fixation with non-legumes. The American University in Cairo Press. Cairo, Egypt.
- Boddey, R. M. 1987. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. CRC Critical Reviews. Plant Sci. VI: 209-266.
- Carrizo-de Bellone, S. 2000. Microorganismos fijadores de nitrógeno asociados a partes aérea de la caña de azúcar. Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán, Argentina.
- Cavalcante, V. A. y J. Döbereiner. 1988. A new acid tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugar cane. Plant Soil 108: 23-31.
- Clements, H. F. 1980. Sugarcane: crop logging and crop control: principles and practices. University of Hawaii. Honolulu, Hawaii.
- Döbereiner, J., V. L. D. Baldani, F. Olivares y V. M. Reis. 1993. Endophytic diazotrophs: the key to BNF in gramineous plants. pp. 395-408. In: N. A. Hegazi, M. Fayed y M. Monib (eds.). Nitrogen fixation with non-legumes. Faculty of Agriculture, Cairo University. Giza, Egypt.
- Döbereiner, J., V. L. D. Baldani y J. L. Baldani. 1995a. Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas nao-leguminosas. MAARA-EMBRAPA-CNPAB. Brasilia, Brazil.
- Döbereiner, J., V. L. D. Baldani y V. M. Reis. 1995b. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: I. Fendrik. *Azospirillum* VI Related Microorganisms. NATO ASI Series, Series G, Ecological Sciences, Series 37. Springer Verlag. New York, NY, USA.
- Falk, E. C., J. Döbereiner, J. L. Johnson y N. R. Krieg. 1985. Deoxyribonucleic acid homology of *Azospirillum amazonense* and emendation of the description of the genus *Azospirillum*. Int. J. Syst. Bacteriol. 35: 117-118.
- Fu, H. y R. H. Burris. 1989. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. J. Bacteriol. 171: 3168-3175.
- Girard, H. y R. Rougieux. 1964. Técnicas de microbiología agrícola. Acribia. Zaragoza, España.
- Gumbel, E. J. 1954. Statistical theory of extreme values and some practical applications. Applied mathematics series 33. US Department of Commerce, National Bureau of Standards. Washington, DC, USA.
- James, E. K. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field Crops Res. 65: 197-209.
- James, E. K., F. Olivares, A. L. M. Olivera, F. B. dos Reis, L. G. da Silva y V. M. Reis. 2001. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. Exp. Bot. 52: 747-760.
- Medina, R. 1999. Resumen climatológico. Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán, Argentina.
- Olivares, F. L., V. L. D. Baldani, V. M. Reis, J. L. Baldani y J. Döbereiner. 1996. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stem and leaves predominantly of Gramineae. Biol. Fert. Soils 21:197-200.
- Pedraza, R. O. y J. C. Diaz-Ricci. 2003. Genetic stability of *Azospirillum brasilense* after passing through the root interior of sugarcane. Symbiosis 34: 69-83.
- Reis, V. M., Y. Zang y R. H. Burris. 1990. Regulation of nitrogenase by ammonium and oxygen in *Acetobacter diazotrophicus*. Anais da Academia Brasileira de Ciencias 62: 317.